

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	大林 史誠
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
Genetic diagnosis of Cowden syndrome (CS) and establishment of CS-specific induced pluripotent stem cells (iPSC) for the study of disease mechanisms (Cowden 症候群の遺伝子診断及び同疾患由来人工多能性幹細胞 (iPSC) の樹立と同細胞を用いた疾患研究)			
論文審査担当者			
主査	教授	加藤 功一	印
審査委員	教授	藤井 万紀子	
審査委員	准教授	虎谷 茂昭	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>Cowden 症候群 (CS) は口腔及び消化管の多発性腫瘍や皮膚病変を主症状とし、高頻度に乳がんや甲状腺がんを発症する常染色体優性遺伝性疾患であり、がん抑制遺伝子 PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) の変異が関与していると考えられている。本研究では、口腔粘膜の多発性腫瘍形成を主訴に広島大学病院顎・口腔外科を受診した患者に対して臨床診断及び遺伝子診断を行い CS の確定診断を行うと共に、CS 患者由来末梢リンパ球 (CS-PBMC) より無血清・無フィーダー細胞培養条件で iPSC 細胞 (CS-iPSC) を樹立し、同細胞を用いて疾患研究を行った。</p> <p>CS が疑われた患者の末梢血由来 DNA 用いて遺伝子解析を行った (広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認研究計画：第ヒ 72 号)。遺伝子解析には次世代シーケンサーを使用し、先天性疾患の表現型に関わる 4813 遺伝子の全エクソンの塩基配列を網羅的に解析した。さらに、CS-PBMC より CS-iPSC の誘導・樹立を行った (広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認研究計画：第ヒ 58 号)。比重遠心法を用いて分離した PBMC を RD6F に IL-2 を添加した無血清培地にて初代培養した後、1×10^5 個の細胞を laminin 処理 dish (6well-dish) 上に播種し、センダイウィルスベクター-SeVdp (KOSM) 302L を MOI=6 で 2 時間感染させた。iPSC の誘導効率は、alkaline phosphatase (ALP) 陽性コロニー数の誘導時の細胞数に対する比率を算定することで求めた。また、各種未分化マーカー遺伝子 (<i>OCT3/4</i>, <i>Nanog</i>, <i>Sox2</i>, <i>Rex1</i>) 及び蛋白 (<i>Oct3/4</i>, <i>Nanog</i>, <i>SSEA3</i>) の発現を解析するとともに、多分化能の評価として、<i>in vitro</i> 分化誘導実験 (胚様体形成法) にて各種分化マーカー (βIII tubulin, αSMA, AFP) 蛋白発現を検討し、さらに <i>in vivo</i> 分化誘導実験 (Teratoma 形成法試験) において 3 胚葉への分化能を組織学的に検討した。<i>Pten</i> 遺伝子の発現量を droplet digital PCR (ddPCR) 法で検討すると共に、<i>Pten</i> mRNA の配列解析を行った。PTEN、AKT 及びリン酸化 AKT 蛋白の発現を western blot 法にて解析した。また、Bio-Plex 装置を用いて AKT シグナル関連蛋白のリン酸化レベルを網羅的に検討した。さらに bisulfite シーケンス法を用いて</p>			

Pten プロモーター領域の変異及びメチル化について解析を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1 臨床的に CS が疑われた患者に対して、Next-generation sequencing 解析により *Pten* 遺伝子の変異(c.1020Del.T, c.1026G>A)を明らかにした。また、今回同定した同遺伝子の変異部位は、今まで報告されていない新規の変異であった。
- 2 フィーダーフリー・無血清培養条件で未分化性及び分化多能性を有する同症候群特異的 CS-iPSC の樹立に成功した。
- 3 ALP 活性を指標にした CS-iPSC の誘導効率は 0.24%であり、健常人由来 iPSC (WT-iPSC) の誘導効率の 0.05%と比較して有意に高いことが明らかとなった。
- 4 WT-iPSC と比較して CS-iPSC では *Pten* mRNA 及び PTEN 蛋白の発現は約 1/2 に低下し、さらにリン酸化 AKT 蛋白の発現上昇を認めた。
- 5 CS-iPSC において、*Pten* プロモーター領域の変異やメチル化異常は認められなかった。
- 6 CS-iPSC において上記変異に起因する *Pten* mRNA の splicing 異常により PTEN 蛋白のハプロ不全が生じることで、本症候群が発症していることが考えられた。

以上の結果から、本 CS における *Pten* 遺伝子発現低下の機構とその発症機構が明らかになり、本培養系での CS-iPSC を用いた研究は本疾患の病態のさらなる解明や治療法の開発のみならず、*Pten* 遺伝子変異に伴う発癌機構の解明や予防にも貢献できると考えられた。

本論文は先天性疾患及び癌研究の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。